Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. N. Henning

Untersuchungen über die lipolytische Aktivität antiatherosklerotischer Medikamente

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen-Nürnberg

Vorgelegt von
Manfred Sauer
aus Nürnberg

1964

D 29

Gedruckt mit Genehmigung
der
Medizinischen Fakultät
der
Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. Theissing

Referent: Prof. Dr. Henning

Tag der mündlichen Prüfung: 3. 3. 1964

Sonderdruck aus:

»ARZNEIMITTEL-FORSCHUNG«
»DRUG RESEARCH«
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) **13**, 718—722 (1963)
Editio Cantor / Aulendorf i. Württ.

Aus der
Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg;
Direktor: Professor Dr. N. Henning

Die lipolytische Aktivität einiger antiatherosklerotischer Medikamente

Von

H. Schön und M. Sauer

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg; Direktor: Professor Dr. N. Henning

Die lipolytische Aktivität einiger antiatherosklerotischer Medikamente

Von H. Schön und M. Sauer

Im Jahre 1943 machte Hahn [1] bei Untersuchungen über die Erythrocyten-Zirkulation die Feststellung, daß eine Blutinfusion, der als Antikoagulans Heparin zugesetzt war, eine rasche optische „Klärung" der Lipämie bewirkte und 5 min post infusionem gewonnene Proben vollkommen klar waren. Diese Klärwirkung trat noch stärker hervor, wenn man reines Heparin injizierte. Versuche, durch Heparin-Zusatz in vitro eine Klärung zu erzielen, schlugen fehl.

Diese Beobachtungen wurden erst 1950 von Anderson u. Fawcett [2] aufgegriffen, die in vitro eine Klärung erzielten, indem sie statt reinen Heparins Postheparinplasma verwendeten und dieses mit dem lipämischen Plasma incubierten. Die Tatsache, daß Postheparinplasma, nicht aber reines Heparin die Klärung auslöste, ließ den Schluß zu, daß durch das Heparin zunächst ein sogenannter „Lipämieklärfaktor" oder kurz „Klärfaktor" induziert wird. Diesem Klärfaktor identische Substanzen konnte später Anfinsen [3] aus Herz und Pylorusmuskulatur und Korn [4] aus dem Fettgewebe gewinnen (unlängst auch aus Kuhmilch [5].

Nichols, Freeman u. Shore [6] konnten 1952 direkt durch Titration freier Fettsäuren (FFS) nachweisen, daß bei der Klärung eine fermentative Spaltung der in den Lipoproteiden enthaltenen Triglyceride zu Partialglyceriden, Glycerin und FFS abläuft. Da dieser Fermentmechanismus an den Lipoproteiden des Plasmas ansetzte und Korn [7] die Lipoproteide bzw. Chylomikronen als spezifisches Substrat für dieses Ferment erkannte, nannte er den Klärfaktor Lipoproteidlipase*).

Man spricht heute dann von einem „Klärfaktor", wenn es sich um die Beseitigung der lipämischen Trübung handelt, von „Lipoproteidlipase", wenn darunter die fermentative Spaltung der Triglyceride zu Glycerin und FFS verstanden wird [8]. Bei dieser Festlegung darf allerdings nicht übersehen werden,

*) Die damalige Identifizierung von Klärfaktor und Lipoproteidlipase führte immer wieder zu Meinungsverschiedenheiten, so daß auf Symposien („Nahrungsfett und Atherosklerose" Erlangen und „Lipoproteidlipase" Wien) immer wieder der Versuch einer strengen Unterscheidung dieser beiden Begriffe unternommen wurde.

daß sich die Unterscheidung auf die Methodik bezieht und keine Aussage über den zugrunde liegenden Mechanismus zuläßt.

Eine andere Meinung vertritt Zöllner [9], der in der Klärung einen physikalischen Vorgang sieht, wobei die Chylomikronen in schwerere Lipoproteide umgewandelt und so aktiviert werden, daß die Lipoproteidlipase (LPL) angreifen kann (ähnlich der Substrataktivierung durch die Gallensäuren für die Pankreaslipase).

Obgleich die Bedeutung der im Blutplasma enthaltenen LPL für den Fett-Transport noch völlig unklar ist, kann man doch einige wenige Punkte als fundiert betrachen: Auf die Injektion von Heparin erscheint im Plasma ein Enzym, das normalerweise nicht in bemerkenswerter Menge vorhanden ist. Dieses Enzym, die Lipoproteidlipase, katalysiert die Hydrolyse des Triglyceridanteils der Chylomikronen und anderer Lipoproteide niederer Dichte mit einer darauf folgenden Klärung des lipämischen Plasmas.

Ein diesem in jeder Hinsicht gleiches Enzym kann auch aus bestimmten Zellen (Basophile und Mastzellen) normaler Tiere extrahiert werden, was mit der Möglichkeit rechnen läßt, daß diese Zellen eine Quelle des durch Heparin induzierten Enzyms sind [10].

Verantwortlich für die Klärreaktion sind die Chylomikronen (0,5—1 μ groß), die als spezifisches Substrat für die LPL gelten, und die bei einem größeren Triglyceridgehalt des Plasmas als 20 mÄ/L veresterte Fettsäuren als lipämische Serumtrübung sichtbar werden. Sie bestehen neben kleinen Mengen Phosphatiden, Cholesterin und Protein zu 86% aus Triglyceriden. Eine Analyse der Klärwirkung zeigt, daß diese Chylomikronen verschwinden und die LPL gleichzeitig durch hydrolytische Spaltung Fettsäuren aus dem Triglyceridanteil der Lipoproteide freisetzt.

Ebenso wie auf lipämisches Plasma wirkt die LPL auch auf künstlich hergestellte Fettemulsionen, wenn sie vorher mit Plasma incubiert wurden; eine typische Eigenschaft der LPL, die sie von den anderen Lipasen unterscheidet.

Mit Abnahme der Trübung kommt es zum Anstieg der FFS und des Glycerins; dabei geht die Triglyceridhydrolyse über die Zwischenstufen der Di- und Monoglyceride vor sich [11].

Bei den Reaktionsprodukten Glycerin — FFS entstehen anfangs die freien Fettsäuren schneller. Bei einem bestimmten Verhältnis Triglycerid:Spaltprodukt erhält man ein Reaktionsgleichgewicht, und die Reaktion kommt zum Stehen, wenn die frei werdenden Fettsäuren nicht entfernt werden. Am besten eignen sich hierzu Serumalbumin, aber auch α- und β-Lipoproteide. Das Lipoproteidendprodukt ist das seiner Triglyceride beraubte Chylomikron, das schwerer wird und im oberen Bereich der α-Lipoproteide untertaucht (Klärung). Die frühere Meinung, die Chylomikronen würden in den α-Lipoproteidbereich überwechseln, dürfte heute als überholt gelten.

Die Characteristica des Enzyms wurden von Boyle, Anfinsen u. Brown näher untersucht. Sie fanden, daß sich die LPL thermisch (> 60° C) inaktivieren ließ, ebenso durch Chymotrypsin und hohe Salzkonzentrationen. Korn fand das Wirkungsoptimum bei 40° C und einem pH von 7,3 bis 7,5. Mit Protamin, Triton (ein p-isooktylpolyoxyäthylen-phenol-Polymer)*) und hohen Salzkonzentrationen konnte eine Hemmung erzielt werden.

Für die Aktivitätsmessung der LPL stehen zwei Methoden zur Verfügung: Die eine basiert auf einer Messung der Trübungsabnahme eines lipämischen Plasmas oder einer Fettemulsion nach Zusatz von Postheparinplasma während eines bestimmten Zeitabschnitts. Dieses Verfahren ist wenig befriedigend und kann bestenfalls zu Vergleichszwecken herangezogen werden. Die sich viel-

*) Es bewirkt einen beträchtlichen Anstieg der Plasmatrübung.

fach widersprechenden Ergebnisse dürften in erster Linie auf die methodische Unzulänglichkeit zurückzuführen sein: Man findet kein Substratoptimum, es kann Agglutination und Aufrahmung der Fettteilchen eintreten oder die Trübung durch sich bildende Kalkseifen bedingt sein. Die meisten Autoren sind sich heute über die Unzulänglichkeit dieser Methode einig [12] um so mehr, als Kern u. Sanders [13] eine Klärung auch ohne Freisetzung von Fettsäuren festgestellt haben.

Die zweite, wesentlich exaktere Methode beruht auf einer direkten Bestimmung der bei der Reaktion freigesetzten Fettsäuren und des Glycerins, wobei die Glycerinbestimmung ebenfalls noch Ungenauigkeiten wegen der Mitbestimmung des an Mono- und Diglyceride gebundenen Glycerins liefern kann.

Als exakteste Methode hat sich bis jetzt die titrimerische Bestimmung der freien Fettsäuren erwiesen. Die Abweichungen lagen bei den verschiedenen Modifikationen, einschließlich der manometrischen, zwischen ± 0,2 und 1,4%.

Unsere Untersuchungen hatten die klinische Prüfung verschiedener Präparate zum Ziel, denen lipolytische Eigenschaften zugeschrieben werden. Wir bedienten uns dabei einer titrimetrischen Methode, deren Brauchbarkeit und Reproduzierbarkeit in eingehenden Vorversuchen kontrolliert worden war.

METHODE UND MATERIAL

Es wurde das Verfahren von Dole [14] in der Modifikation nach Desnuelle [15] zur Bestimmung der freien Fettsäuren verwendet.

Extraktionsgemisch

40 Teile Isopropylalkohol, 10 Teile Heptan, 1 Teil n-H_2SO_4. Alle Lösungen waren doppelt destilliert; das Heptan wurde außerdem über basischem Aluminumoxyd (Aktivitätsstufe I) aufbewahrt.

Indikator

Aus einer 0,1%igen Thymolblau-Stammlösung in Wasser wurde durch Verdünnung eine 0,01%ige Lösung hergestellt, von der ein Teil mit 9 Teilen 90%igem Äthylalkohol als Indikator verwendet wurde.

Alkali

Es wurde eine 0,5 n NaOH aus Titrisol-Ampullen hergestellt und unter Stickstoffatmosphäre aufbewahrt. Die Titerkontrolle erfolgte mit 0,02 n Palmitinsäurelösung in Heptan.

Arbeitsweise

Den Versuchspersonen wurde morgens Nüchternblut entnommen (6,5 cm^3), das mit 1,5 cm^3 4%iger Natriumcitratlösung ungerinnbar gemacht wurde. Hierauf injizierten wir eine bestimmte Menge eines den Klärfaktor induzierenden Stoffes (nähere Angaben bei den einzelnen Versuchen). In Abständen von 30 und 60 min wurde jeweils die gleiche Menge Citratblut mit einer Venüle (8 cm^3 Citratvenülen mit 1,5 cm^3 4%iger Na-Citratlösung) entnommen. Der Patient blieb in dieser Zeit nüchtern. Nach dem Erkalten wurde das Blut 10 min bei 2000 U.p.M. zentrifugiert.

Das Gemisch für die nun folgende Incubation setzte sich folgendermaßen zusammen:

2,0 ml Nüchtern- bzw. Postheparinplasma,
1,0 ml Normalplasma (Mischplasma),
0,5 ml einer Fettemulsion (Intralipid, Vitrum, 10%ig),
4,5 ml Phosphatpuffer (KH_2PO_4—Na_2HPO_4, pH 7,8).

Am günstigsten ist es, wenn die Incubationsmischung bis auf das Postheparinplasma bereits vor dem Versuch zusammengestellt wird, so daß das Plasma sofort nach dem Zentrifugieren zugegeben und mit der Incubation begonnen werden kann. Die Meßansätze incl. Leerwerte laufen als Doppelbestimmung.

Vor der Incubation sowie 30 und 60 min danach, werden 1 ml des Incubationsgemisches sowie 5 ml des Extraktionsgemisches in ein

Reagenzglas mit Schliffstopfen gegeben und kräftig geschüttelt. Nachdem dieses System etwa 10 min gestanden hat, gibt man 2 ml Wasser und 2 ml Heptan zu und läßt die Röhrchen nach kurzem Schütteln noch 5 min stehen.

Titration

Titriert wird mit einer Agla-Mikrobürette 0,5 ml in einem Titrationsgefäß nach Desnuelle unter N_2-Durchfluß. In das Gefäß (s. Abb. 1) geben wir 1 ml der Titrationslösung und 2 ml der oberen Heptanphase die sich inzwischen im Reagenzglas scharf von der unteren getrennt hat.

Man läßt langsam einen N_2-Strom durch das Gemisch perlen und titriert bis zu einem zeisiggrünen Umschlagspunkt (bekommt die Lösung einen blaugrünen Stich, so ist sie bereits übertitriert). Zur genaueren Feststellung des Umschlagspunktes kann der Gasstrom ab und zu unterbrochen werden. Gut zu beobachten ist die Farbe, wenn man bei seitlich einfallendem Licht gegen einen weißen Hintergrund titriert.

Nach der Titration kann das Gemisch aus dem unteren Hahn abgelassen und sofort mit der nächsten Probe begonnen werden. Abweichungen von Mehrfachbestimmungen liegen bei ± 0,9 bis 2%.

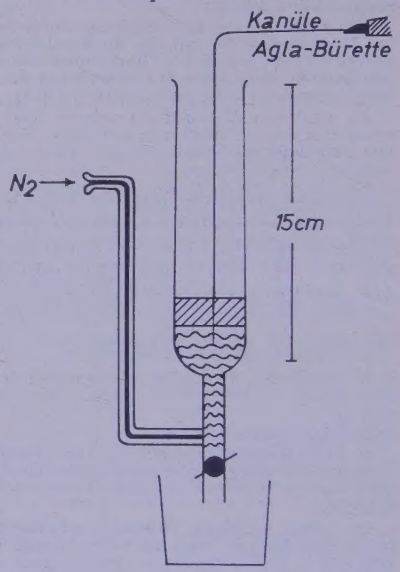

Abb. 1: Titrationsgefäß nach Desnuelle.

Vorversuche

1. pH-Optimum

Beim Studium der einzelnen Arbeiten stellte sich heraus, daß die Ansichten über das pH-Optimum weit auseinandergingen und zwar von pH 7,2 [16] über pH 8,0 [17] bis zu einem pH von 8,3 [10]. Wir führten deshalb eigene Versuche durch, um das für unsere Verhältnisse günstigste Optimum zu erzielen.

3 Patienten wurde 30 min nach Injektion von 50 mg Heparin (Liquemin®) Blut entnommen und wie oben beschrieben bei 37° C mit einem Barbital-Acetatpuffer incubiert. Die Ansätze liefen bei einem pH von 7,2, 7,4, 7,6, 7,8, 8,0 und 8,2.

Daß der Wert von 7,8 am günstigsten war, zeigt Abb. 2.

2. Sicherung der Methodik

Um später die verschiedenen Substanzen auf ihre lipolytische Aktivität prüfen zu können, führten wir eine Versuchsreihe mit reinem Heparin (Liquemin®) aus. Dabei wurde 12 Versuchspersonen Heparin injiziert (3 VP 4000, 3 VP 6000 und 6 VP 5000 Einheiten) und die LPL-Aktivität des Postheparinplasmas (30-min-Wert) wie oben beschrieben bestimmt.

Ergebnis

Alle Versuche zeigten eine gut meßbare Freisetzung von FFS (Abb. 3).

3. Hemmversuche

Zur weiteren Sicherung der Methodik führten wir Hemmversuche mit Desoxycholsäure (Decholin®), einem spezifischen Inhibitor, durch.

Das 30 min nach Injektion gewonnene Plasma wird mit 0,2 ml (~ 15,3 µmol) bzw. 0,4 ml (~ 30,6 µmol) Desoxycholsäure (Decholin®, 5%) versetzt und bei 37° C bebrütet.

Ergebnis

Man kann bei den Ansätzen mit 0,2 ml bereits eine deutliche Abnahme der Aktivität feststellen; bei den 0,4-ml-Ansätzen gehen die Werte fast auf 0 zurück (Abb. 4).

Anstieg der FFS nach 30 und 60 min Incubation mit und ohne Desoxycholsäure. Die ersten drei Versuche mit 15,3 µmol, die beiden letzten mit 30,6 µmol Decholin.

ERGEBNISSE

I. Oral verabreichte Medikamente

1. Heparin — Natriumsalz

Unsere Versuchspersonen erhielten zwischen 6000 und 9000 I.E. Heparin als Na-Salz*) in Form von Tabletten zu 1500 Einheiten. Die Blutproben wurden nach 1 und 2 h entnommen und der Anstieg der FFS untersucht.

Ergebnis

Weder bei der niedrigen noch bei hoher Dosierung konnte eine Freisetzung von FFS festgestellt werden. Die prozentuale Abweichung vom Ausgangswert zeigt Tab. 1.

2. Ateroid®**)

Beim Ateroid handelt es sich um ein natürlich gewonnenes Heparinoid aus dem gereinigten Extrakt

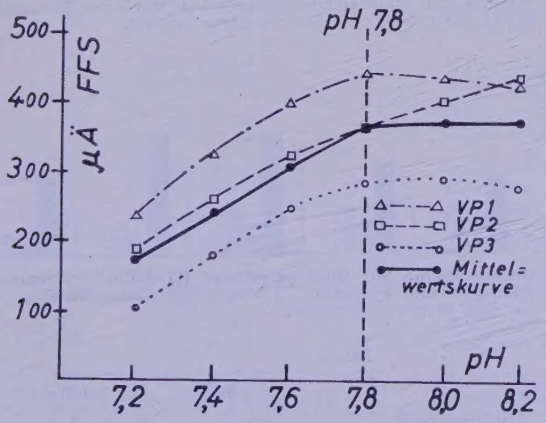

Abb. 2: Abszisse: pH-Wert. Ordinate: µÄ freigesetzte Fettsäuren. Die Abb. zeigt die 3 von verschiedenen Versuchspersonen (VP) gewonnenen Kurven sowie die Mittelwertskurve mit dem Optimum bei pH 7,8.

*) Nordmark-Werke, Uetersen. Wir danken der Firma an dieser Stelle für die freundliche Überlassung der Muster.

**) Fa. Crinos, Mailand.

der Mucosa. Biochemisch stellt es ein Sulfomucopolysaccharid dar, in dem die Aminogruppe mit einer Acetylgruppe verestert ist.

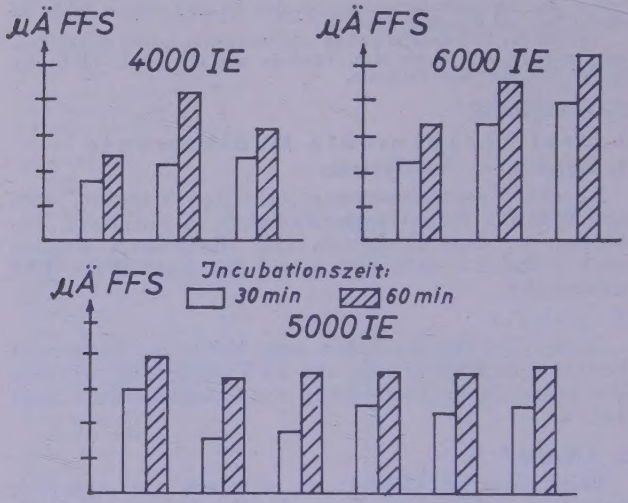

Abb. 3: Anstieg der FFS nach Injektion von 4000, 5000 und 6000 I.E. Heparin und einer Incubationszeit von 30 min (weiße) und 60 min (schraffierte Säulen) in µÄ/ml Ansatz.

Abb. 4: Hemmversuche mit Desoxycholsäure (Decholin®). Incubationszeit: Ohne Decholin 30 min 60min. Mit Decholin 30 min 60 min.

Die Versuchspersonen erhielten je 6 Tabletten à 10 mg Heparinoid. Die Blutproben wurden wiederum nach 1 u. 2 h entnommen.

Tab. 1

VP	1-h-Wert in %	2-h-Wert in %
1	+ 4,8	— 3,0
2	— 5,4	+ 1,8
3	— 3,6	+ 3,5
4	— 1,4	— 1,4
5	+3,9	+ 1,9

Tab. 2

VP	1-h-Wert in %	2-h-Wert in %
1	— 0,9	+ 1,2
2	— 3,1	+ 0,0
3	+ 1,7	+ 1,6
4	+ 9,1	+ 9,8
5	+ 1,7	+ 1,5

Ergebnis

Sämtliche Messungen der FFS fielen negativ aus; es konnte kein Ansteigen der FFS beobachtet werden. Die prozentuale Abweichung bei den einzelnen VPP zeigt Tab. 2.

II. Intravenös verabreichte Medikamente

Bei allen iv. Versuchen wurden, falls sie eine lipolytische Aktivität zeigten, Kontrollversuche mit einem Heparinpräparat an derselben Versuchsperson vorgenommen. In unserem Fall verwendeten wir Thrombophob®*) (Dosierung: 0,75 mg/kg Körpergewicht ≈ 90 bis 110 I.E.).

1. Heparinoid SP 54**)

Sp 54 stellt ein halbsynthetisch gewonnenes, sulfuriertes Polysaccharid dar mit einem Molekulargewicht

Tab. 3

VP	Blutentn. nach Inj. min	Anstieg d. FFS nach Inc. von	VP	Blutentn. nach Inj. min	Anstieg d. FFS nach Inc. von
1	30	30 min 300 µÄ 60 min 616 µÄ	6	30	30 min 406 µÄ 60 min 632 µÄ
	60	30 min 300 µÄ 60 min 600 µÄ		60	30 min 330 µÄ 60 min 630 µÄ
2	30	30 min 482 µÄ 60 min 632 µÄ	7	30	30 min 271 µÄ 60 min 531 µÄ
	60	30 min 632 µÄ 60 min 708 µÄ		60	30 min 284 µÄ 60 min 546 µÄ
3	30	30 min 376 µÄ 60 min 626 µÄ	8	30	30 min 270 µÄ 60 min 618 µÄ
	60	30 min 421 µÄ 60 min 721 µÄ		60	30 min 271 µÄ 60 min 586 µÄ
4	30	30 min 120 µÄ 60 min 380 µÄ	9	30	30 min 260 µÄ 60 min 455 µÄ
	60	30 min 105 µÄ 60 min 391 µÄ		60	30 min 260 µÄ 60 min 455 µÄ
5	30	30 min 210 µÄ 60 min 572 µÄ	10	30	30 min 362 µÄ 60 min 588 µÄ
	60	30 min 300 µÄ 60 min 600 µÄ		60	30 min 391 µÄ 60 min 677 µÄ

*) Nordmark-Werke, Uetersen.
**) Fa. Bene-Chemie, München.

von 2000 (Nativ-Heparin 12000–20000).

Den Versuchspersonen wurden nüchtern 100 mg injiziert und die Blutproben nach 30 und 60 min entnommen.

Ergebnis

Es ergab sich eine deutliche Freisetzung von FFS, die der des Thrombophob sehr nahekommt, wie aus Tab. 3 u. 4 sowie Abb. 5 ersichtlich ist.

Tab. 4: Thrombophob — Vergleichsversuche.

VP	Gew. kg	mg Thromb	Blutentn. n. Inj. min	Anstieg d. FFS nach Inc. von
1	72	54	30	30 min 481 µÄ 60 min 857 µÄ
			60	30 min 452 µÄ 60 min 828 µÄ
2	44	33	30	30 min 540 µÄ 60 min 800 µÄ
			60	30 min 540 µÄ 60 min 670 µÄ
3	60	45	30	30 min 572 µÄ 60 min 858 µÄ
			60	30 min 466 µÄ 60 min 717 µÄ

2. Nicotinsäure

6 Versuchspersonen wurden im Zeitraum von 15 min 100 mg Nicotinsäure (Nicotinamid® *) iv. injiziert und 30 und 60 min nach Injektion Blutproben entnommen (die Zeit wurde vom Beginn der Injektion an gerechnet).

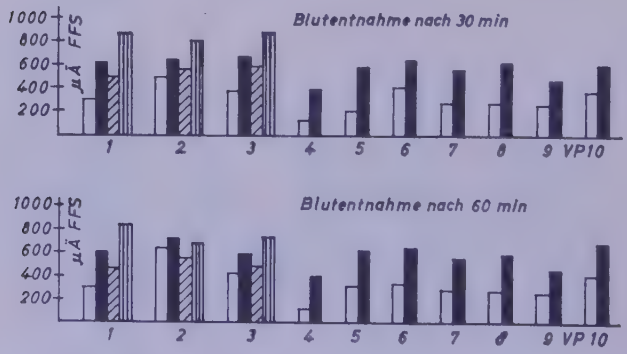

Abb. 5: Anstieg der FFS nach Incubation von Sp 54: □ 30 min, ■ 60 min; nach Thrombophob: ▨ 30 min, ▥ 60 min. Abszisse: Anzahl der Versuchspersonen. Ordinate: FFS in Ä. Menge der freigesetzten FFS des Postheparin-Wertes von 30 min (oben) und 60 min (unten) nach einer Incubationszeit von 30 und 60 min. Bei den ersten 3 VPP die Vergleichswerte mit Heparin.

*) Dr. A. Wander GmbH, Frankfurt a. M.

Tab. 5

VP	30-min-Wert in %	60-min-Wert in %
1	9,8	9,9
2	3,0	— 0,4
3	8,4	3,5
4	0,3	— 0,5
5	0,0	— 1,2
6	0,0	5,2

Ergebnis

Es konnte keine Freisetzung von Fettsäuren beobachtet werden. Die prozentualen Abweichungen vom Ausgangswert zeigt Tab. 5.

Tab. 6

VP	Blutentn. nach Inj. min	Anstieg d. FFS nach Inc. von	VP	Blutentn. nach Inj. min	Anstieg d. FFS nach Inc. von
1	30	30 min 241 µÄ 60 min 436 µÄ	6	30	30 min 347 µÄ 60 min 633 µÄ
	60	30 min 195 µÄ 60 min 376 µÄ		60	30 min 286 µÄ 60 min 376 µÄ
2	30	30 min 330 µÄ 60 min 525 µÄ	7	30	30 min 260 µÄ 60 min 520 µÄ
	60	30 min 210 µÄ 60 min 255 µÄ		60	30 min 180 µÄ 60 min 400 µÄ
3	30	30 min 300 µÄ 60 min 510 µÄ	8	30	30 min 300 µÄ 60 min 480 µÄ
	60	30 min 136 µÄ 60 min 287 µÄ		60	30 min 260 µÄ 60 min 520 µÄ
4	30	30 min 226 µÄ 60 min 332 µÄ	9	30	30 min 286 µÄ 60 min 527 µÄ
	60	30 min 151 µÄ 60 min 302 µÄ		60	30 min 176 µÄ 60 min 352 µÄ
5	30	30 min 210 µÄ 60 min 436 µÄ	10	30	30 min 286 µÄ 60 min 437 µÄ
	60	30 min 195 µÄ 60 min 341 µÄ		60	30 min 176 µÄ 60 min 327 µÄ
			11	30	30 min 226 µÄ 60 min 403 µÄ
				60	30 min 151 µÄ 60 min 327 µÄ

3. Heparinoid (Ro 1—8307)

Bei Ro 1—8307*) handelt es sich ebenfalls um ein teilsynthetisches Heparinoid und zwar um einen N-Formylchytosan-polyschwefelsäureester, der trotz seiner geringen gerinnungshemmenden Wirkung eine gute Klärwirkung zeigen soll. Es wurde an 11 Versuchs-

*) Deutsche Hoffmann-La Roche AG, Grenzach/Baden.

personen geprüft. Dosierung: 100 mg Ro 1—8307. Die Blutentnahme erfolgte wieder nach 30 und 60 min. Bei 4 Versuchspersonen wurden wiederum Vergleichsversuche mit Thrombophob ausgeführt.

Ergebnis

Jede Versuchsreihe zeigte gut meßbare Ergebnisse. Die Menge der freigesetzten Fettsäuren entsprach im

Tab. 7: Vergleichsversuche mit Thrombophob.

VP	kg Gew.	mg Thromb	Blutentn. n. Inj. min	Anstieg d. FFS nach Inc. von
1	81	60	30	30 min 195 µÄ 60 min 421 µÄ
			60	30 min 316 µÄ 60 min 492 µÄ
2	60	45	30	30 min 496 µÄ 60 min 722 µÄ
			60	30 min 391 µÄ 60 min 681 µÄ
3	63	48	30	30 min 586 µÄ 60 min 782 µÄ
			60	30 min 526 µÄ 60 min 736 µÄ
4	72	54	30	30 min 496 µÄ 60 min 820 µÄ
			60	30 min 421 µÄ 60 min 707 µÄ

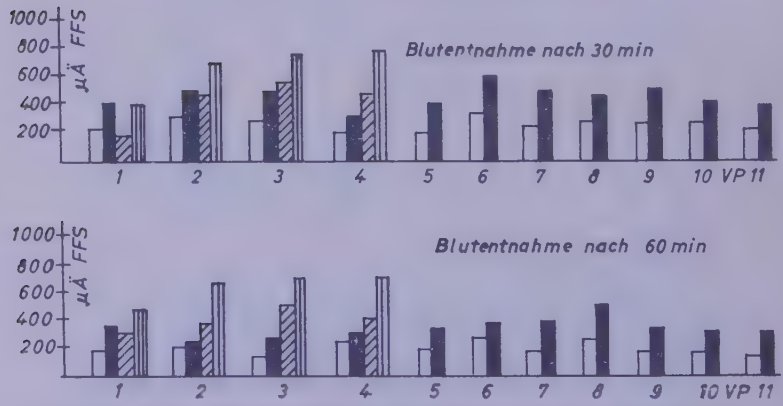

Abb. 6: Anstieg der FFS nach Incubation von Ro-1-8307: ▭ 30 min, ▬ 60 min, nach Thrombophob: ▨ 30 min, ▮ 60 min. Im übrigen s. Abb. 5.

Mittel 40—50% der des reinen Heparins (Tab. 6). Vergleichsversuche mit Thrombophob zeigt Tab. 7 (s. auch Abb. 6).

4. Essentielle Phospholipoide (EPL)

7 Versuchspersonen wurden 100 mg essentielle Phospholipoide*) iv. injiziert. Die Blutentnahme erfolgte nach 30 und 60 min.

Tab. 8

VP	30-min-Wert in %	60-min-Wert in %
1	+ 3,1	+ 1,3
2	+ 5,1	+ 2,0
3	+ 7,8	+ 7,4
4	+ 7,4	+ 1,8
5	— 5,2	— 6,3
6	— 3,4	± 0,0
7	± 0,0	+ 3,2

Ergebnis

Keine Freisetzung von FFS; Tab. 8 zeigt die prozentuale Abweichungen vom Ausgangswert.

DISKUSSION

Die Regulationsmechanismen des Fettabtransportes aus dem Blut sind bisher nur ungenügend bekannt. Frühere Ergebnisse über die intravasale Beteiligung der Postheparin-Lipoproteidlipase an der „Klärung" (Beschleunigung des Fettabtransportes) der postprandialen Hyperlipämie werden durch neuere Untersuchungen in Frage gestellt. Die größte Menge des in das Blut einströmenden Fettes wird ungespalten von der Leber und von den Fettdepots nach extravasaler Hydrolyse aufgenommen [27].

Andererseits wird nach Verabreichung kleiner Heparin-Dosen der Fettabtransport aus dem Blut („Fettklärung") deutlich beschleunigt (es verschwinden maximal bis zu 30 g — entsprechend 0,034 Mol — in 60 min nach 5000 I.E. Heparin iv.). An einer Fettklärwirkung des Heparins kann demnach nicht gezweifelt werden. Es erhebt sich aber die Frage, ob die lipolytische (Postheparin-Lipoproteidlipase) Wirkung nur ein Teileffekt einer viel komplexeren Beeinflussung ist. Zu prüfen bleibt deshalb, ob sich bei anderen Substanzen mit Klärwirkung eine Dissoziation dieser beiden Angriffspunkte nachweisen läßt.

Die Fähigkeit der sublingualen Heparin- oder Heparinoid-Applikation eine Klärreaktion bzw. eine Freisetzung von freien Fettsäuren zu bewirken, muß nach unseren Untersuchungen verneint werden.

Bei Heparin sublingual wollen Selman u. Shaftel [18, 19] schon bei 1500 I.E. merkbare, bei 4500 I.E. sogar sehr gute Klärungsergebnisse erzielt haben. Das erscheint insofern erstaunlich, als bei unseren Versuchen mit 9000 I.E. keine Klärung, d. h. eine Auf-

*) Fa. A. Natterman u. Cie, Köln.

spaltung der Triglyceride, auftrat. Ob die Unterschiede in der verschiedenen Auffassung von „Klärung" liegen, oder ob die Tatsache eine Rolle spielt, daß die Autoren das Kaliumsalz an Stelle des von uns benutzten Natriumsalzes verwendeten, kann nicht entschieden werden. Den Beweis in vivo dafür, daß keine Freisetzung einer Lipoproteidlipase erfolgt, liefern auch Schön u. Braune [20], die in Fettbelastungsversuchen selbst nach Gaben von 6000 I.E. keinen Einfluß auf den Fettabtransport aus dem Blut feststellen konnten.

Ateroid bietet in der Literatur noch wenige Vergleichsmöglichkeiten. Die vorliegenden Untersuchungen [21, 22, 23] beschränkten sich auf Behandlungen über lange Zeit, wobei die Autoren schon mit 4 Tabletten (40 mg) täglich eine gute Wirkung erzielt haben wollen.

Allein die Versuche mit iv. Heparin- und Heparinoid-Applikation zeigten positive Ergebnisse. Beim Vergleich mit reinem Heparin*) konnten mit dem Heparinoid SP 54 die weitaus günstigsten Ergebnisse erzielt werden. Die vom Hersteller angegebene Klärwirkung von 82% eines Reinheparins wurden erreicht; sie lagen in manchen Fällen sogar noch höher und übertrafen in einem Fall die Wirkung des Heparins.

Die ersten qualitativen Versuche mit Ro 1—8307 stammen von Studer [24], der die Klärwirkung dieses Präparates erstmals nachwies. Quantitativ gefestigt wurden die Ergebnisse durch Reber [25], der bis zu 6 mg/kg injizierte und das optimale Ergebnis mit 1 mg/kg Heparinoid erreichte. Nach Applikation von 100 mg Ro 1—8307 sahen wir 40—50% der Wirkung eines Heparins; dabei lagen die 60-min-Werte günstiger als die 30-min-Werte.

Besonders wichtig für die Erklärung der Wirkungsweise von Nicotinsäure und „essentiellen" Phosphatiden auf den Fettabtransport aus dem Blut sind die hierzu vorgelegten Prüfungen der LPL-Aktivität. Während sowohl für Nicotinsäure als auch für „essentielle" Phosphatide bei iv. Applikation eine wesentliche Senkung des Blutfettspiegels im akuten Versuch nachgewiesen werden konnte [27], zeigen unsere Ergebnisse, daß das Lipoproteidlipase-System an diesem Vorgang unbeteiligt ist. Damit wird es erstmals erwiesen, daß die Fett-„Klärung" auch ohne Freisetzung von Lipoproteidlipase erfolgen kann [26].

In weiteren Untersuchungen bleibt zu prüfen, ob die nach iv. Heparin- oder Heparinoid-Applikation

*) Wir sind uns bewußt, daß ein Vergleich Heparin:Heparinoid nicht ohne weiteres möglich ist; aber es mußte ein ungefähres Bezugssystem gefunden werden, um die verschiedenen Medikamente zu bewerten.

im Blut nachweisbare LPL-Aktivität für die Fettklärung nur ein zwar auffälliger, quantitativ aber unwesentlicher Nebenbefund ist.

Zusammenfassung

Es wurde die Freisetzung von Lipoproteidlipase-Aktivität im Plasma nach Applikation verschiedener antiatherosklerotischer Präparate mittels titrimetrischer Methode beobachtet. Während sich orale bzw. sublinguale Heparin- und Heparinoid-Präparate als wirkungslos erwiesen, zeigten in den Versuchen mit iv. Verabreichung der Heparinoide SP 54 (ein sulfuriertes Polysaccharid mit einem Molekulargewicht von 2000) und Ro 1—8307 (ein Formylchytosan-polyschwefelsäureester), die beide halbsynthetisch gewonnen werden, sehr gute bis gute Ergebnisse. Dabei entspricht SP 54 in seiner lipolytischen Wirkung etwa der des Reinheparins. Nach iv. verabreichter Nicotinsäure und „essentiellen" Phosphatiden fand sich keine Veränderung der Lipoproteidlipase-Aktivität.

Summary

The Lipolytic Activity of Some Anti-Atherosclerotic Drugs

The liberation of plasma lipoproteinlipase following the administration of various anti-atherosclerotic drugs was titrimetrically studied. While heparin and heparinoids by the oral or sublingual route proved ineffective, i.v. administration of the heparinoids SP 54 (a semi-synthetic sulphurised polysaccharide with a molecular weight of 2000), and Ro 1—8307 (a semi-synthetic formylchytosan polysulphuric ester) results ranging from satisfactory to good were obtained. SP 54, in its lipolytic activity approaches that of pure heparin. Following i.v. administration of nicotinic acid and "essential" phosphatides no change was observed in lipoprotein lipase activity.

Literatur

[1] Hahn, P. F., Science **98**, 19 (1943)
[2] Anderson, N. G. u. Fawcett, B., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **74**, 768 (1950)
[3] Anfinsen, C. B., Boyle, E. u. Brown, R. K., Science **115**, 583 (1952)
[4] Korn, E. D. u. Quigley, T. W., J. Biol. Chem. **226**, 833 (1957)
[5] Korn, E. D., J. Lipid Research **3**, 246 (1962)
[6] Shore, B., Nichols, A. V. u. Freeman, N. K., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **83**, 216 (1953)
[7] Korn, E. D., J. Biol. Chem. **215**, 1 (1955)
[8] Zöllner N., Symposion über Lipoproteidlipase, Wien (1962)
[9] Zöllner, N., Medizin und Ernährung (Nahrungsfett und Atherosklerose) 69 (1960)
[10] Korn, E. D. in Glick, D., „Methods of Biochemical Analysis" **7**, 147, Interscience Publ. New York, London (1959)
[11] Sailer, S., Sandhofer, F. u. Braunsteiner, H., Wiener Ztschr. f. Inn. Med. **74**, 9 (1962)
[12] Havel, R. J. u. Peterson, M., Circulation **18**, 496 (1958)

[13] Kern, F. jr. u. Sanders B. B., Gastroenterology **40**, 533 (1961)
[14] Dole, V. P., J. Clin. Invest. **35**, 150 (1956)
[15] Desnuelle, P., Constantin, M. J. u. Baldy, J., Bull. Soc. Chim. **285**, 37 (1955)
[16] Nakatani, M., Nakamura, M. u. Torii, Sh., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **107**, 853 (1961)
[17] Shore, B. u. Shore, V., Am. J. Physiol. **201**, 915 (1961)
[18] Shaftel, H. E. u. Selman, D., Angiology **10**, 131 (1959)
[19] Fuller, H. L., Angiology **9**, 311 (1958)
[20] Schön, H. u. Braune, P., Arzneim.-Forsch. **13**, 464 (1963)
[21] Bianchini, P., in Garattini u. Paoletti, R., s [23], p. 168
[22] Nicrosini, F. u. Piccinelli, O., in Garattini, S. u. Paoletti, R., s. [23], p. 508
[23] Mazza, F., Benedetti, G. u. Ferretti, G., in Garattini, S. u. Paoletti, R., Drugs Affecting Lipid Metabolism, Elsevier, Amsterdam 1961, p. 556
[24] Studer, A. u. Koller, F., Bull. Akad. Schweiz. Med. Wiss. **13**, 239 (1956)
[25] Reber, K. u. Studer, A., Acta Haematol. **21**, 31 (1959)
[26] Schön, H. u. Grimm, B., in Vorbereitung
[27] Schrade, W., Wissenschaftliche Veröffentlichung der Deutschen Gesellschaft für Ernährung. (Arteriosklerose und Ernährung) **3**, 107, Steinkopff, Darmstadt 1959

Anschr. d. Verff.: Priv.-Doz. Dr. H. Schön u. cand. med. M. Sauer, Medizinische Klinik der Universität, 8520 Erlangen, Krankenhausstr. 12

Verantwortlich für die Redaktion: Dr. W. Saenger, Verlag: Editio Cantor, 796 Aulendorf i. W. Ruf: Aulendorf (07525) 431. — Druck: Vereinigte Buchdruckereien, A. Sandmaier & Sohn, 7952 Bad Buchau.
Bezugsbedingungen: Die Zeitschrift erscheint monatlich einmal. Sie kann vom Verlag oder durch eine Buchhandlung bezogen werden. Der Bezugspreis beträgt im Abonnement pro Halbjahr (6 Hefte) 33,— DM einschl. Versandkosten. Das Einzelheft kostet 6,— DM einschl. Versandkosten. Kostenlose Probehefte liefert der Verlag auf Anforderung.
Auslandsabonnements errechnen sich einschließlich Versand auf der Basis von 72,— DM pro Jahr.

Lebenslauf

Ich wurde am 12. 3. 1937 als Sohn des Zahnarztes Georg Sauer und seiner Ehefrau Rosa Sauer, geb. Weber, in Nürnberg geboren.

1943 trat ich in die Volksschule Oberasbach ein und wechselte im September 1950 in die Oberrealschule Fürth über wo ich im Juli 1958 das Abitur ablegte.

Darauf immatrikulierte ich mich im selben Jahr an der Universität Erlangen für das Studium der Zahnmedizin. Im Februar 1961 machte ich das Physikum und ging darauf an die Freie Universität Berlin. Im November 1961 kehrte ich an die Universität Erlangen zurück und beendete im Februar 1964 mein Studium mit dem Staatsexamen.

Manfred Sauer
Nürnberg, Am Stadtpark 45